

ARTICLES

Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase

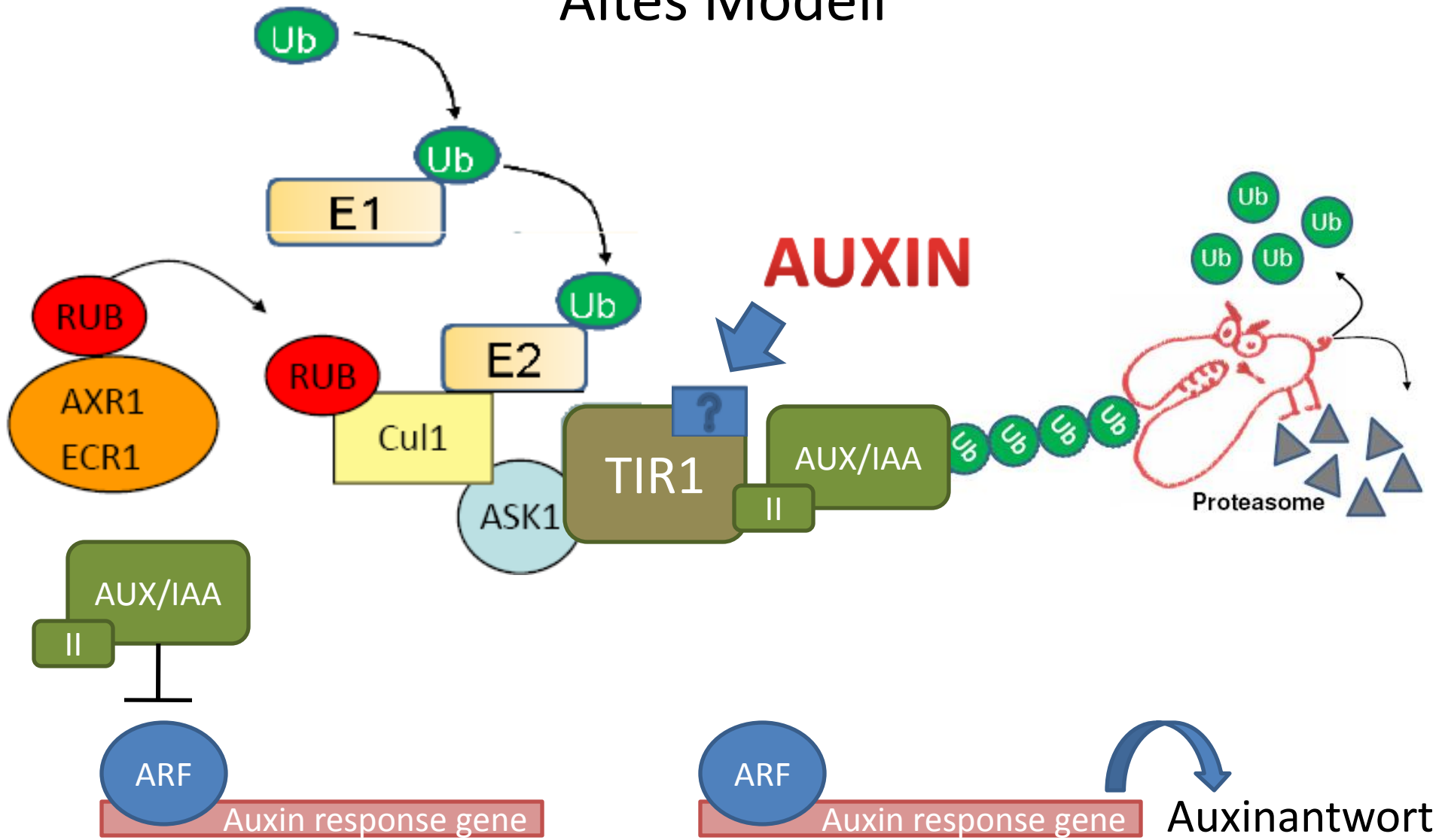
Xu Tan¹, Luz Irina A. Calderon-Villalobos², Michal Sharon³, Changxue Zheng¹, Carol V. Robinson³, Mark Estelle² & Ning Zheng¹

Nina Dombrowski

Martin Weyhe

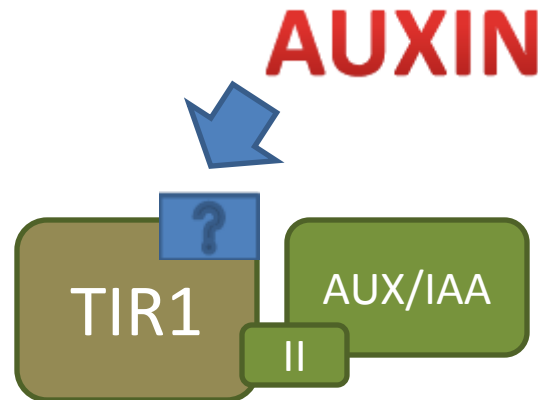
17.06.2009

Altes Modell



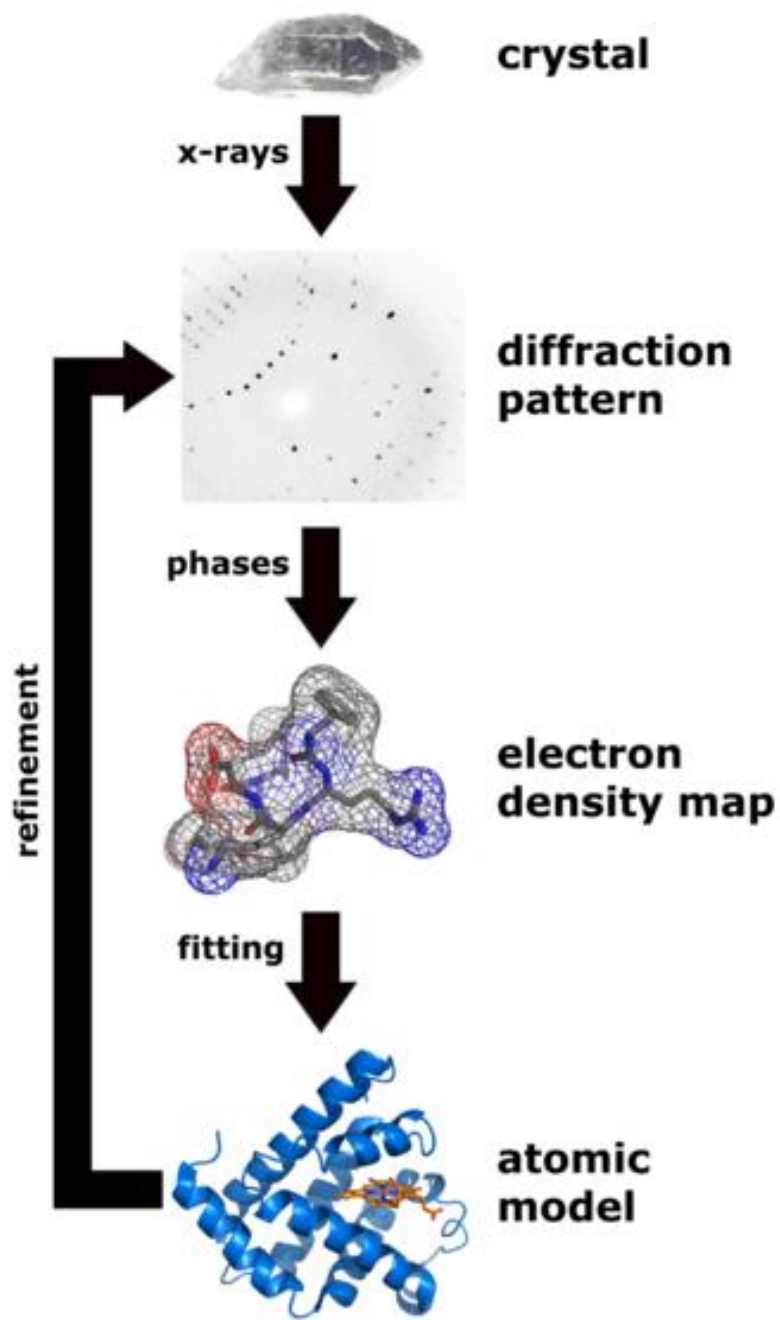
Ziele

Welche molekularen Mechanismen wirken bei der Erkennung von Auxin durch TIR1?



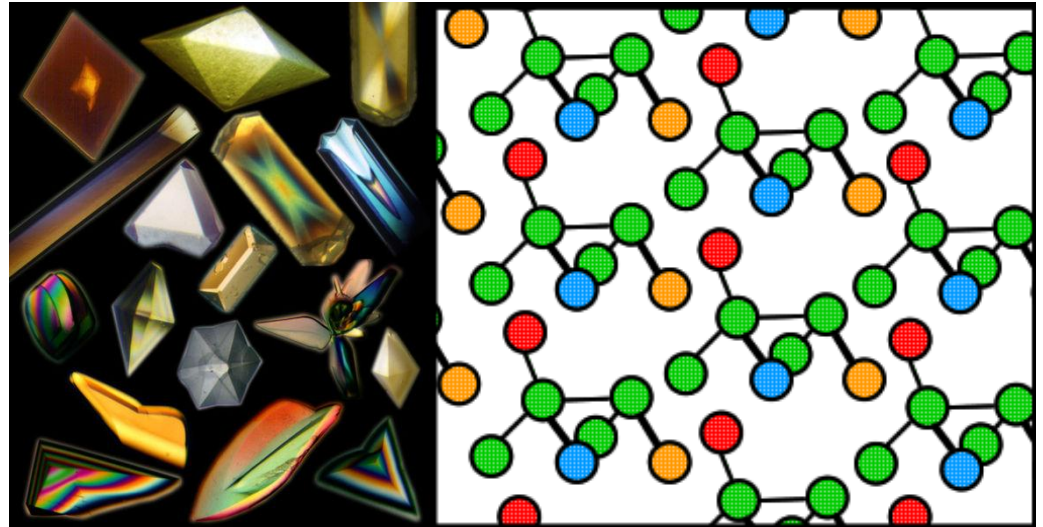
→ Proteinkristallstruktur

TIR1-ASK1 Komplex und IAA7 Peptid +/- Auxin



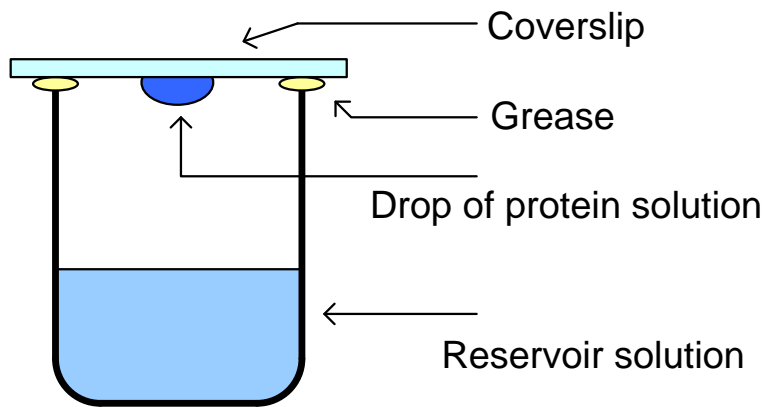
Proteinkristallisation

- Für Röntgenstrukturanalyse
hochgeordnete Struktur notwendig → Kristall
- Gereinigtes Protein langsam in Lösung ausgefällt
- Individuelle Bedingungen für jeweiliges Protein
 - pH
 - Fällmittel
 - Temperatur
 - Proteinkonzentration ...

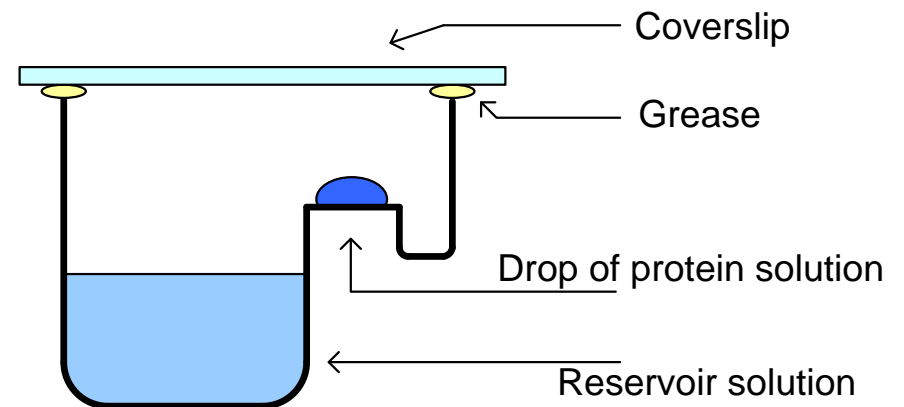


Vapour Diffusion

Hanging Drop

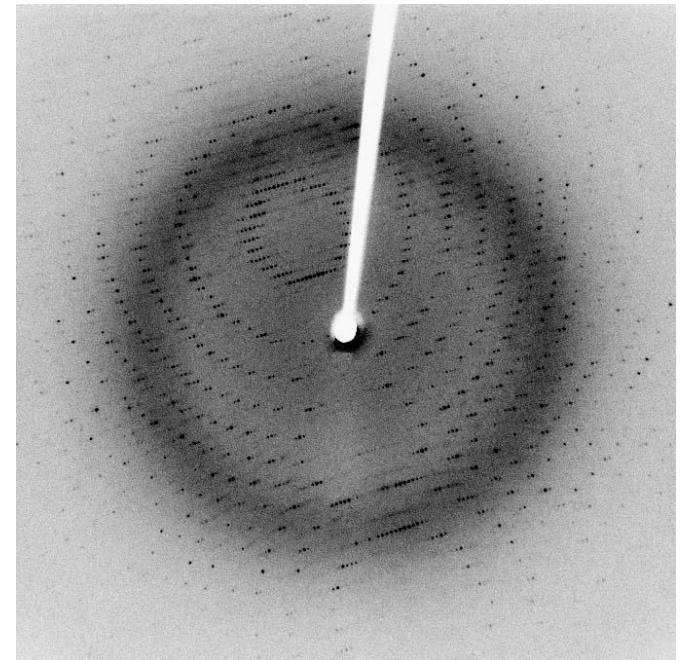
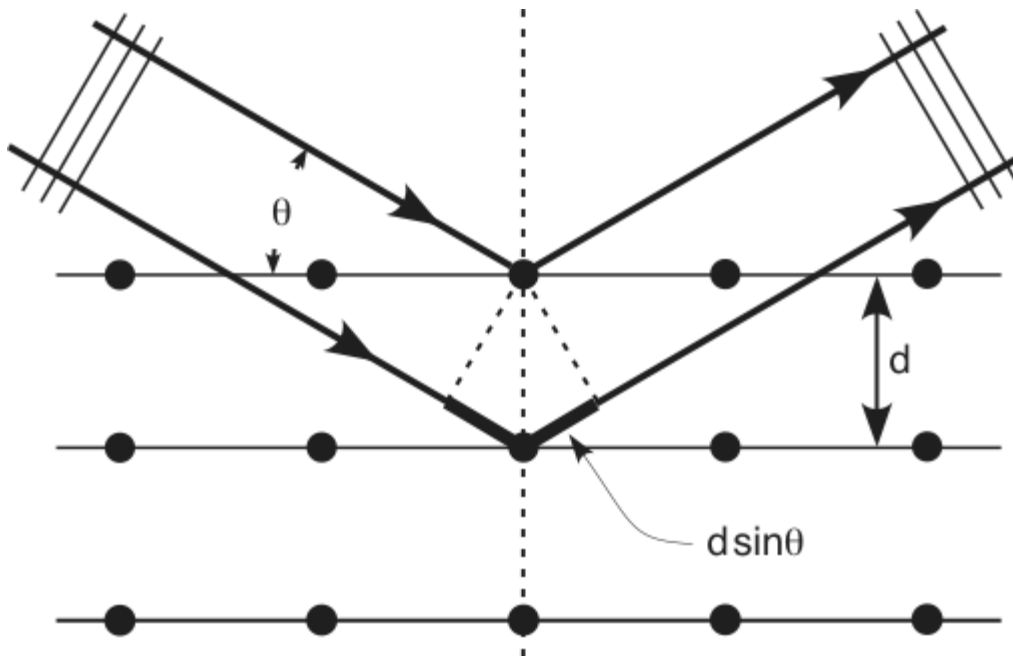


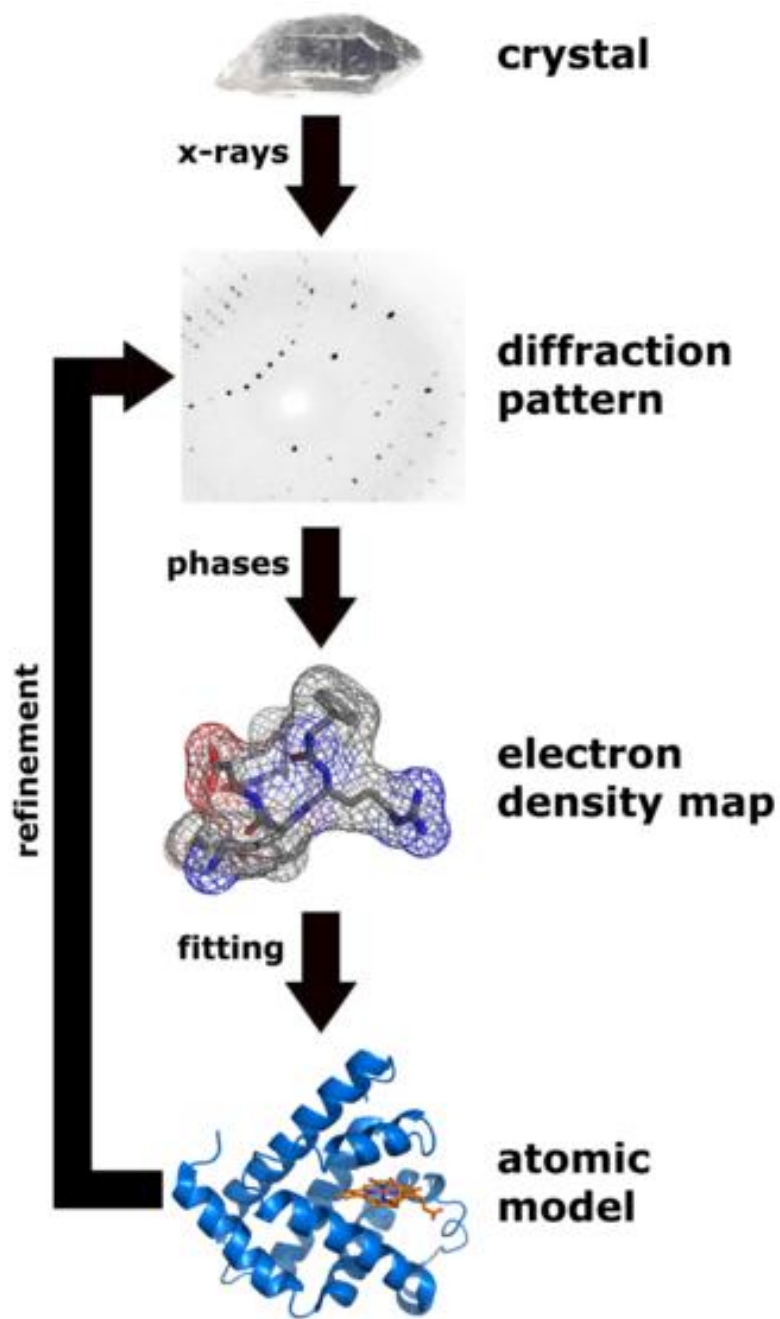
Sitting Drop

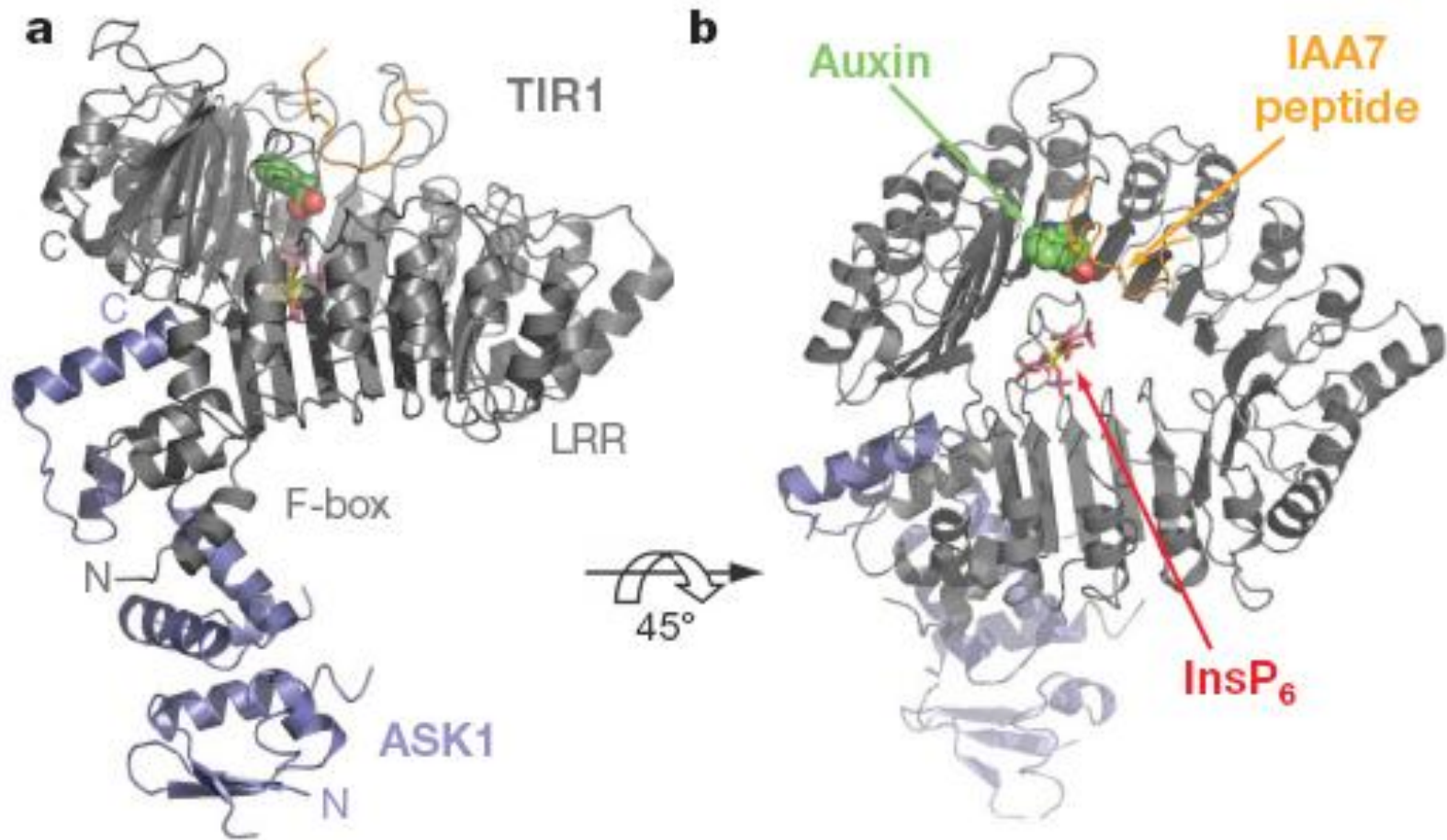


Röntgenstrukturanalyse

- Röntgenstrahlen werden an Elektronen gebeugt
- Aus Beugungsmuster kann die Elektronenverteilung ermittelt werden



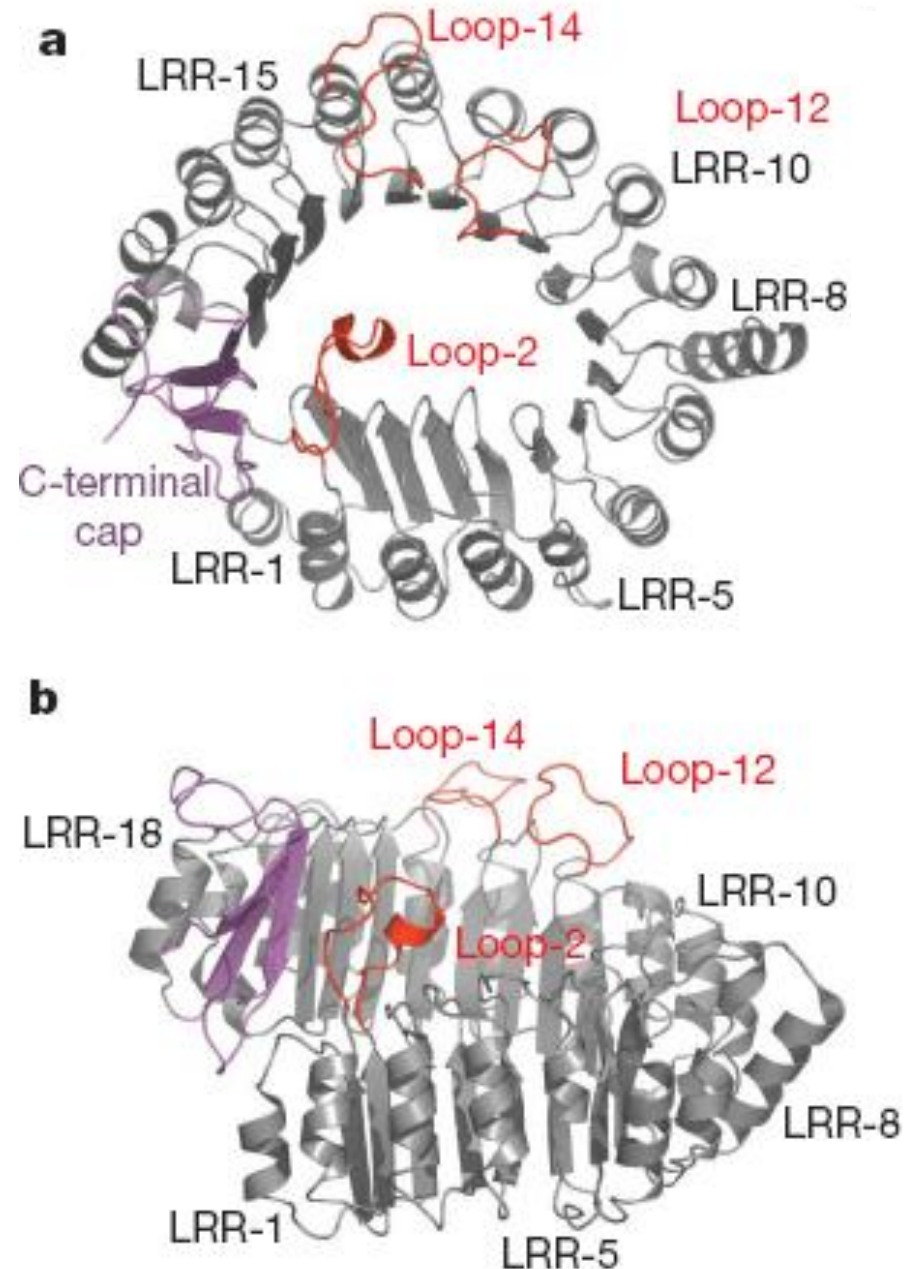
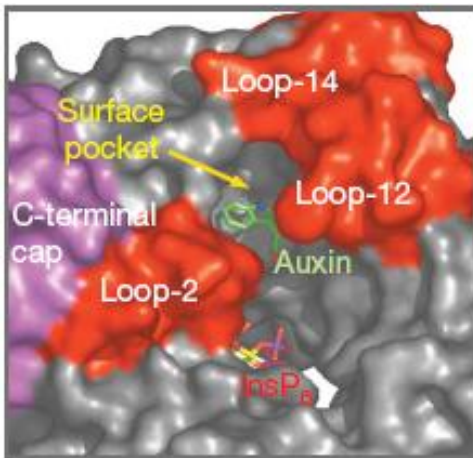




- LRR Domäne für Auxinbindung und IAA7 Rekrutierung verantwortlich
- InsP₆ (Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat) mitisoliert

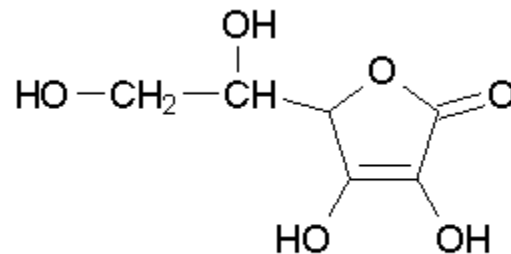
TIR1-LRR Domäne

- Besteht aus 18 LRRs + C-terminal cap
- Spiralige Struktur (one coil helix):
 β -sheets innen
 α -Helices außen
- Loop 2, 12 & 14 formen mit β -sheets
Auxin- & substrat-binding-pocket

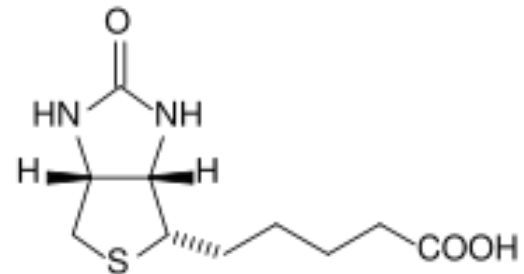


Co-Faktoren

- Nicht-Proteinanteil eines Enzyms (org. Moleküle, Metallionen)
- Beeinflussen der Reaktion durch Interaktion mit Enzym
- Interaktion kovalent → prosthetische Gruppe oder nicht kovalent
- Chemische Modifikation während Reaktion, Regeneration im Folgeschritt
- Bsp: Ca-, Fe-, Cu- Ionen...



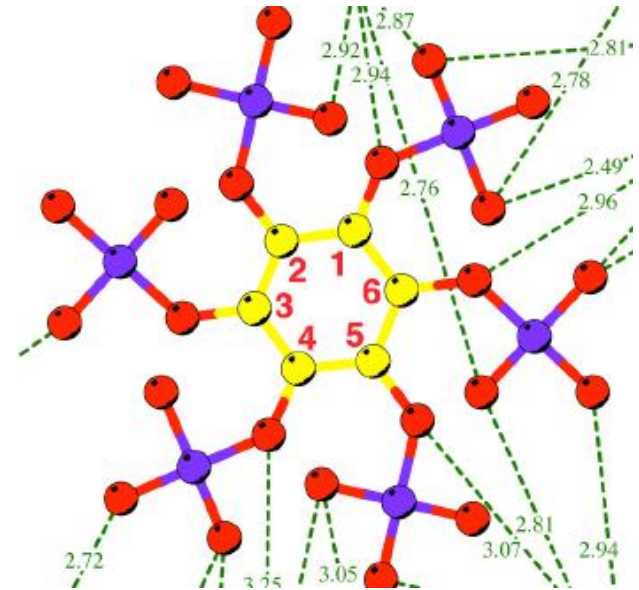
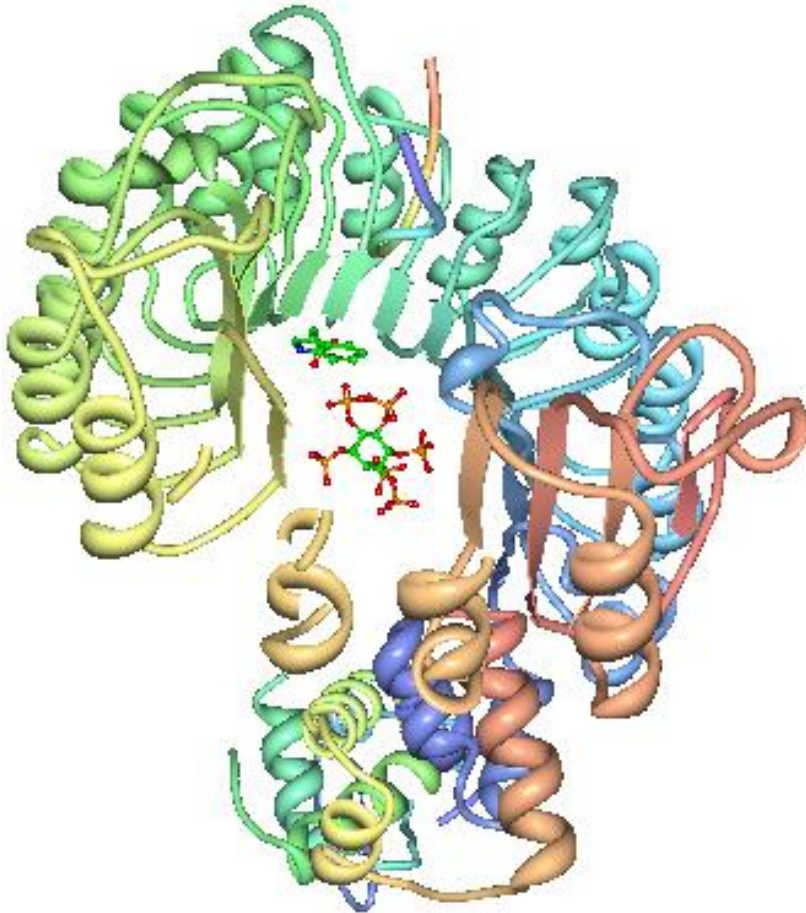
Ascorbinsäure



Biotin

Identifikation von InsP₆ in TIR1

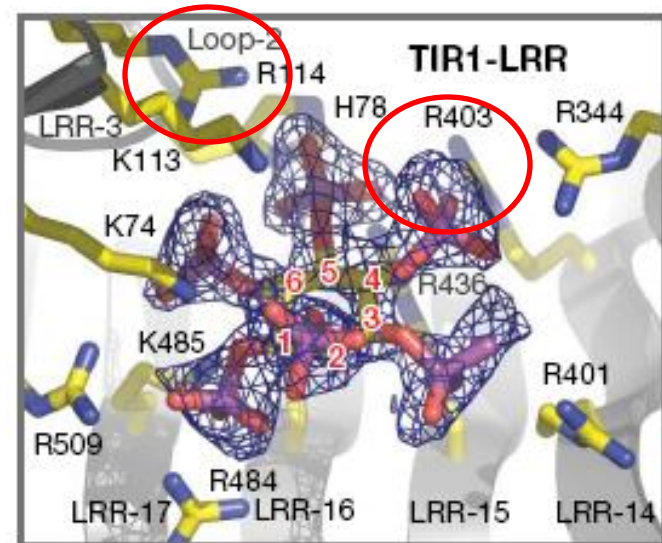
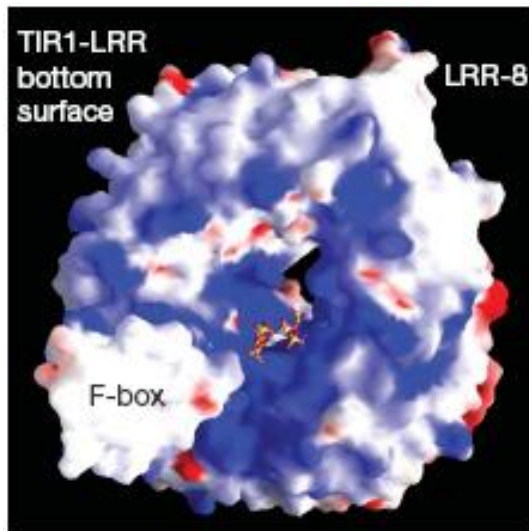
- Inositol-1,2,3,4,5,6 hexakisphosphat



- Reguliert: DNA repair, Endocytose nukleären mRNA Transport
- In Nähe von Auxin binding site

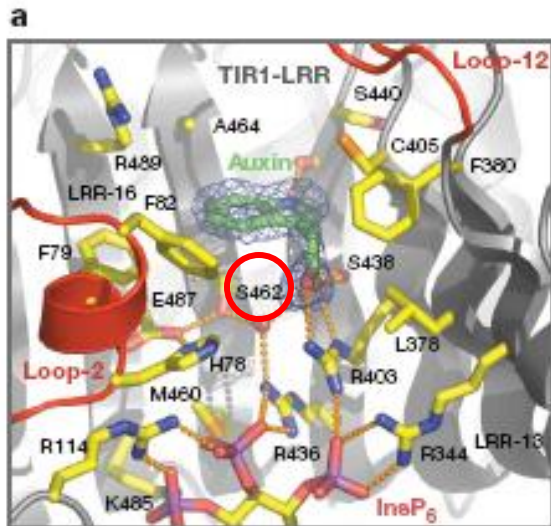
InsP₆ als Co-Faktor von TIR1?

- Enge Assoziation an TIR1, da immer mitgereinigt
- Interagiert mit loop2 und Arg 403
→ Co-Faktor

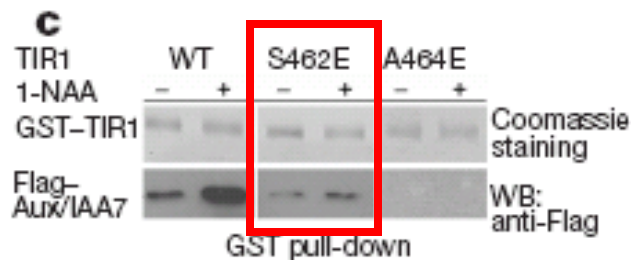


- 8 von 10 basischen Resten in AFBs streng konserviert
→ essentiell für diese F-box-Proteine

Die TIR1 auxin-binding pocket



- 3-Wandiger Raum mit offenem Dach
→ Loop2 bildet eine Wand,
LRR12-LRR16 die anderen
- Boden: TIR1-R von LRR2-loop
- Darunter weitere Reste gebunden an InoP₆
→ Stabilisierung



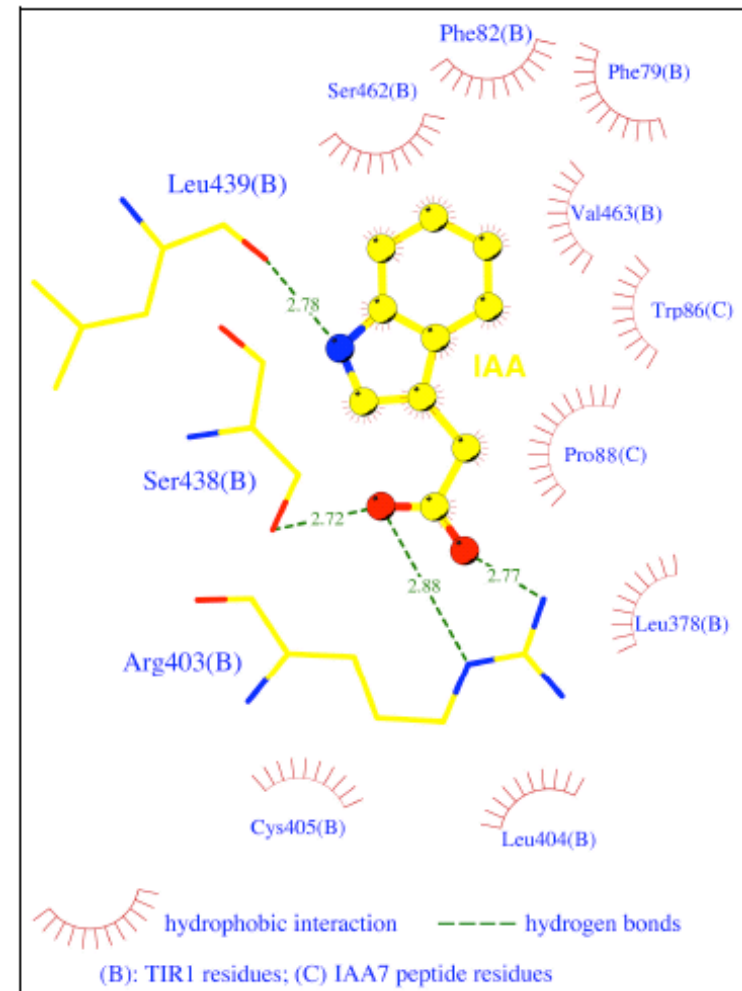
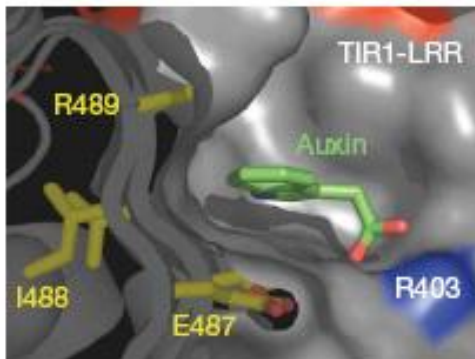
- Integrität des Bodens wichtig für Fkt.
→ AS-Mutation : Verlust der Auxin-erhöhten Bindung

Bindung von Auxin

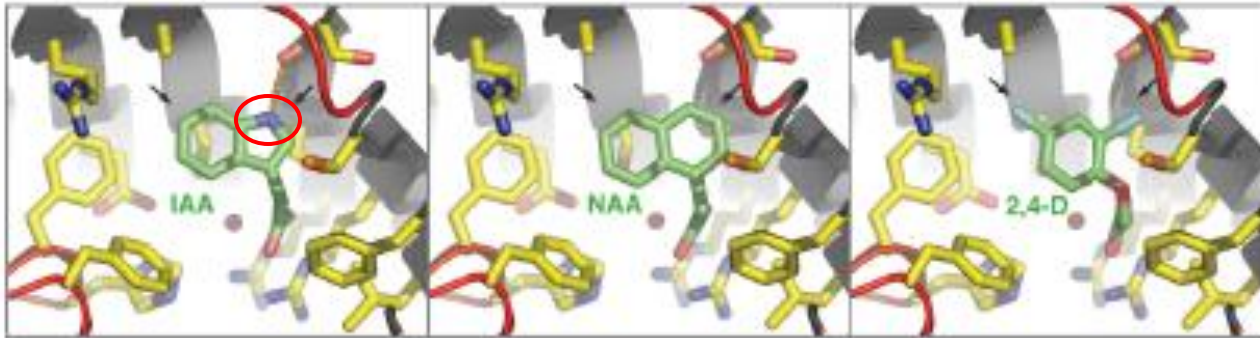
-IAA bindet über **COOH-Gruppe** und Indol-Ring

→COOH verbindet Auxin mit Boden über ionische und 2 H-Brücken-Bdg.

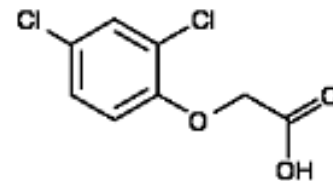
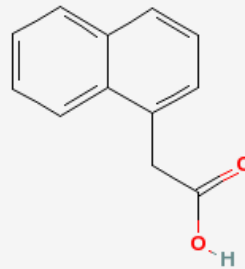
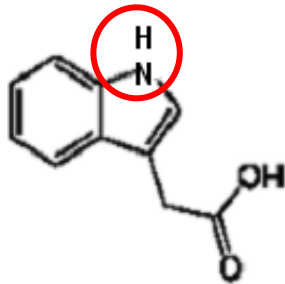
→Indol-Ring: Bindet an die Wände über hydrophobe und Van-der-Waals Bdg.



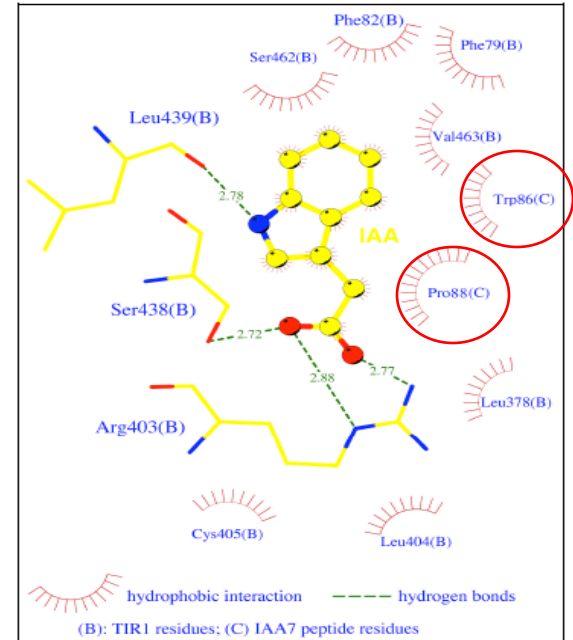
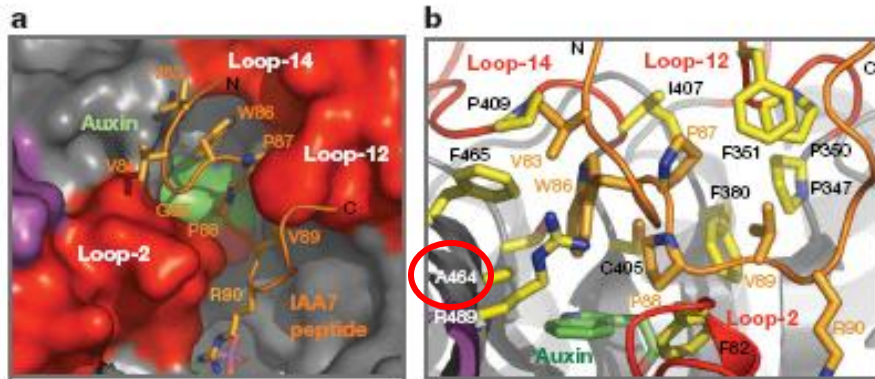
Bindung von Auxin und Derivaten



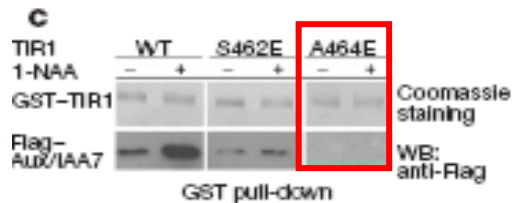
IAA > 1-NAA > 2,4-D



Interaktionen zwischen Substrat und TIR1



- IAA7 mit stark hydrophober Struktur
- Bindet an TIR1 über hydrophobe WW
- Motiv GWPPV wichtig

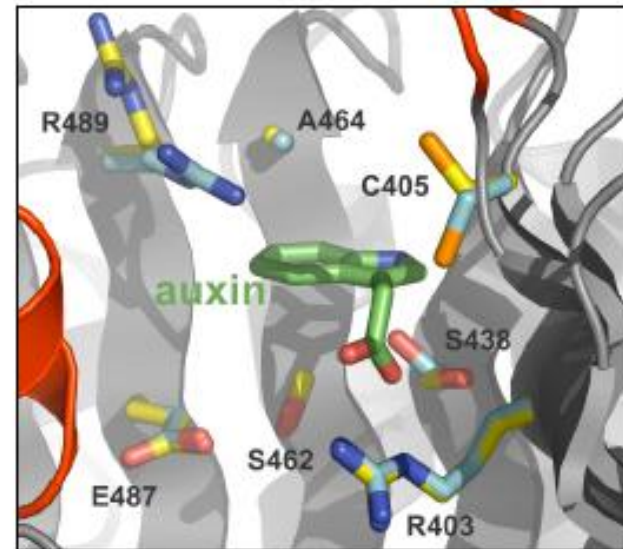


- A464E: nicht polare AS in geladene AS
- Weder basale Bdg. noch Auxin-erhöhte Bdg.

Wie reguliert Auxin die Bindung?

- Auxin:

- kein allosterischer Regulator
- keine Konformationsänderungen
- erhöht IAA7-Bdg.
- vergrößerte Interaktionsfläche
- Agiert als molekularer Kleber

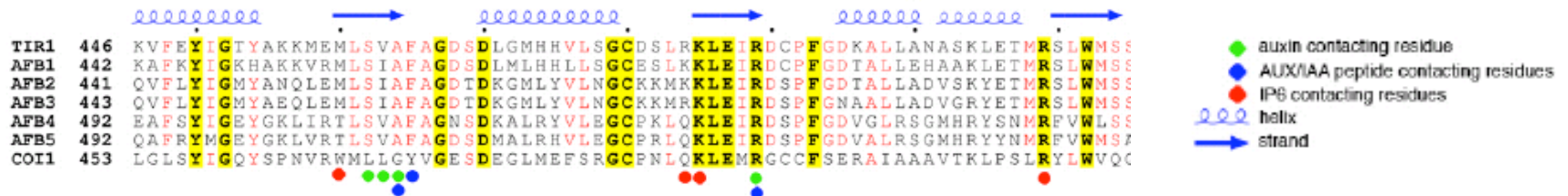


Gelb: TIR1-Reste mit Auxin

Blau: TIR1-Reste ohne Auxin

Diskussion

- Viele Signalwege in Pflanzen durch Ubiquitin-Ligasen kontrolliert
- JA-Signaling benötigt COI1 (F-Box-Protein)
- COI1 mit TIR1-ähnl.-Struktur → Rezeptor?



- Viele Erkrankungen → Defekt in Ubiquitin-Ligase-Substrat-Interaktionen
- Kleine Moleküle könnten Protein-Protein Interaktionen in Ligasen fördern

Zusammenfassung

- LRR-Domäne bildet Auxin-binding-pocket
- InsP₆ als Cofaktor
- Auxin und IAA7 werden über eine einzige Oberflächen-Tasche erkannt
- Bdg. Von Auxin und Derivaten über COOH-Gr. und Indol-Ring über hydrophobe WW



- Aux/IAA bindet über Auxin und schließt die komplette Tasche
- Auxin erhöht die hydrophobe Oberfläche und agiert als molekularer Kleber zwischen TIR1 und Aux/IAA

Neues Modell

